

고포도당으로 자극한 생쥐 메산지움 배양세포에서 mutant MCP-1과 CCR2 siRNA가 fibronectin의 발현에 미치는 영향

의과학 사업단¹, 이화여자대학 의과대학 내과학교실², 연세대학교 의과대학 내과학교실³

박제현¹ · 류동열² · 이금희¹ · 정동섭¹ · 광승재¹ · 이순하¹
한승혁³ · 이정은³ · 김동기³ · 문성진³ · 한대석³ · 강신욱³

The Effects of Mutant MCP-1 and CCR2 siRNA on the Expression of Fibronectin in Mesangial Cells Exposed to High Glucose

Jehyun Park¹, Dong-Ryeol Ryu², Jin Ji Li¹, Dong Sub Jung¹, Seung Jae Kwak¹, Sun Ha Lee¹
Seung Hyeok Han³, Jung Eun Lee³, Dong Ki Kim³, Sung Jin Moon³, Dae Suk Han³, Shin-Wook Kang³

Brain Korea 21¹, Ewha Women², Department of Internal Medicine Yonsei University College of Medicine³

목적 : 당뇨병성 신병증 (DN)은 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로, 여러 성장 인자들에 의한 세포 비후, 세포외 기질의 합성 증가, 그리고 세포외 기질 단백질 분해 효소의 생성 감소 등이 DN의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 그러나, 최근에는 DN에서 염증 세포의 침윤이 확인되었으며, 이러한 염증 반응도 DN의 병태생리에 관여할 것으로 이야기되고 있다. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1과 그의 수용체인 C-C chemokine receptor 2 (CCR2)는 DN에서 염증세포의 신장내로의 이동 및 부착과 밀접하게 연관되어 있으나, 이들이 사구체 메산지움 세포에 미치는 직접적인 영향에 대한 보고는 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 고포도당으로 자극한 생쥐 메산지움 세포 (mouse mesangial cell; MMC)에서 MCP-1과 CCR2가 fibronectin의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방법 : MMC는 5% 우태아혈청이 함유된 DMEM 배양액에서 배양하였으며, 자극 전 24시간동안 혈청을 배제한 배양액으로 배양하였다. 사람 MCP-1 유전자의 N-terminal 말단을 절단한 다음 histidine을 부착하여 제작한 mutant MCP-1 (mMCP-1)과 CCR2 siRNA를 liposomal transfection 방법으로 24시간 동안 세포내로 유입시킨 후 고농도의 포도당 (30 mM D-glucose; HG)으로 24시간 동안 자극하였다. mMCP-1의 세포내로의 유입은 histidine 표현으로, CCR2 siRNA의 유입은 부착된 Cy3의 세포내 형광량으로 확인하였다. mMCP-1과 CCR2 siRNA에 의한 세포 활성의 변화는 MTT 분석으로 측정하였으며, MCP-1과 fibronectin의 발현은 Western blot 분석으로, 그리고 TGF- β_1 의 생성은 ELISA로 분석하였다.

결과 : mMCP-1 transfection 후 세포내 histidine의 표현이 증가하였으며, CCR2 siRNA로 transfection된 세포에서는 Cy3 형광량이 증가되었을 뿐만 아니라 기저 상태의 CCR2 발현이 감소되었다. HG로 자극한 MMC에서 MCP-1과 CCR2의 단백질 발현은 각각 대조군 (5 mM D-glucose; NG)의 155%와 142%로 증가되었으며 ($p < 0.05$), fibronectin의 단백질 발현도 HG에서 NG군의 174%로 증가되었다. MTT 분석상 세포 독성이 없었던 mMCP-1 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 CCR2 siRNA 50 nM은 HG에 의한 fibronectin 단백질 발현 증가를 각각 NG의 76%와 103%로 억제시켰다 ($p < 0.05$). 그러나, mMCP-1이나 CCR2 siRNA가 HG에 의한 TGF- β_1 의 생성 증가에는 전혀 영향이 없었다.

결론 : 이상의 결과로, 당뇨병성 신증의 발생과 진행에 중요한 역할을 담당하는 TGF- β_1 과는 독립적으로 MCP-1과 CCR2가 메산지움 세포에서 세포외 기질의 합성에 직접적으로 관여할 것으로 생각된다.